

# The transmission and segregation of mitochondrial DNA mutations

Citation for published version (APA):

Jacobs, L. J. A. M. (2007). *The transmission and segregation of mitochondrial DNA mutations*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20071213lj>

## Document status and date:

Published: 01/01/2007

## DOI:

[10.26481/dis.20071213lj](https://doi.org/10.26481/dis.20071213lj)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

Mitochondrial encephalomyopathies are disorders associated with abnormalities of the terminal component of mitochondrial energy metabolism, i.e. oxidative phosphorylation (OXPHOS). Recent epidemiological studies have shown that ~1 in 8000 of the general population have an OXPHOS disorder. OXPHOS related diseases therefore cause significant morbidity and mortality. OXPHOS disease can be due to mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear DNA genes. The main topic of this thesis is to define the somatic segregation and familial transmission and, as well, the origin of heteroplasmic mutations in the mtDNA. This is related to their clinical expression and possible modifying factors. The aims were:

- to develop reliable tools that can predict and/or prevent the transmission of mtDNA mutations, like prenatal diagnosis or preimplantation genetic diagnosis;
- to identify factors that influence the severity and nature of the phenotypic manifestations or distribution of the mtDNA load, in order to predict the effect of transmission of mtDNA mutations more accurately;
- to determine the presence and impact of *de novo* mtDNA mutations in oocytes.

These aims have been accomplished by studying patients characteristics coupled to the load of the mtDNA mutations and their transmission as well as by analysing mtDNA mutations in the more unique state of the single cell. For the latter studies mtDNA mutations have been studied in lymphocytes, fibroblasts and oocytes.

Chapter 2 is an introduction to the transmission of OXPHOS disease and methods to prevent this. The expression and segregation of mtDNA mutations is different from nuclear gene defects and the most prominent characteristics of the mtDNA genes and mutations are highlighted. Diseases caused by nuclear gene mutations show a normal Mendelian inheritance pattern and often have more constant clinical manifestations as compared to diseases caused by mtDNA mutations. The heteroplasmic nature of many pathogenic mtDNA mutations is an important feature for disease manifestation, although homoplasmic mutations are known as well. In case of heteroplasmic mtDNA mutations disease usually becomes manifest when the mutation exceeds a tissue-specific threshold. This threshold can vary between tissues and between patients and an exact correlation between mutation load and phenotypic expression is often lacking. The transmission of mtDNA mutations is regarded to be exclusively maternal, although few possible paternal exceptions have been described. The extreme variability in mutation load between siblings, which can already be observed between embryos, is caused by a bottleneck of a limited number of segregating units during early oocyte development. Given the prevalence and severity of OXPHOS diseases and the lack of adequate therapy, existing and new methods for the prevention of transmission of OXPHOS disorders, like prenatal diagnosis (PND), preimplantation genetic diagnosis (PGD), cytoplasmic transfer (CT) and nuclear transfer (NT), are technically and ethically evaluated.

Chapter 3 gives a detailed comparison of the genetic defects and clinical outcome in 2 patients with Pearson syndrome, an often fatal multisystem disease associated with mitochondrial DNA rearrangements, to identify factors, which might be involved in and can predict the severity of the disorder. These rearrangements, which are most frequently deletions, are most likely the result of loop formations between repeat sequences in the mtDNA during mtDNA replication in the developing oocyte. A comparison is made between the presence of deletion dimers (a combination of two deleted fragments) and duplications (a combination of a normal and a deleted fragment) and the outcome of the disease. It is hypothesized that duplications might have a beneficial effect on disease severity. Because of the often *de novo* character of rearrangement the transmission risk is much lower than for the mtDNA point mutations.

Chapter 4 describes a family with three affected children with Leigh syndrome, a progressive neurodegenerative disorder. The disease was diagnosed by clinical features, lactic acidosis and a decrease of complex V activity. Mutation analysis revealed the m.9176T>C mutation in the mtDNA ATPase 6 gene. Because of the pregnancy of a maternal relative of the proband the possibility of prenatal diagnosis (PND), and for a future pregnancy also preimplantation genetic diagnosis (PGD), was evaluated. The main problem was the lack of data on genotype-phenotype correlations for the m.9176T>C mutation and on the variation of the mutation percentage in tissues and in time. Additional data were collected from different maternal relatives for different tissues. Eventually, prenatal diagnosis was offered, with understanding by the couple that there could be considerable uncertainty in the interpretation of the results. Prenatal diagnosis was carried out twice on cultured and uncultured chorion villi and amniotic fluid cells to evaluate tissue and time related effects on the mutation percentage. The fetal mutation percentage turned out to be within a grey area, just below the assumed threshold of expression (90%) and above the arbitrary safe percentage of 60%. The parents decided to continue the pregnancy and a healthy child was born at term after a normal pregnancy. It can be concluded that the challenge for PND in case of mtDNA mutations is not the technique, but the interpretation of the result.

To get a better insight in the distribution of mtDNA mutations among single cells and the potential use for counselling carriers with respect to recurrence risks, the m.9176T>C mutation at the single cell level was studied (chapter 5). The mutation load was determined in single lymphocytes and fibroblasts of several relatives, patients and carriers from the family with the m.9176T>C mutation. The results revealed a skewed distribution pattern of the mutation in both lymphocytes and fibroblasts of three carriers with moderate mutation levels, although the pattern seems more deviant in fibroblasts. In contrast the distribution pattern in lymphocytes and fibroblast of the two patients with very high mutation levels (90%) is close to a normal Gaussian distribution pattern. In one of the carriers an extremely skewed pattern could be observed in fibroblasts going either to 0% and 100% mutation load. Although heteroplasmy is known to migrate to homoplasmy of either the mutation or the wild type by



cell division, our data show that this differs between cell types and individuals and can occur in oocytes more rapidly than expected. This could imply that (genetic) factors exist that influence the distribution pattern and if the same factors would influence the mutation load in oocytes this may help predicting the recurrence risk. The carrier with the extremely skewed distribution has three children with very high mutation loads and severe disease symptoms, which fits with our hypotheses. More single cell studies in larger families are required to determine the predictive power of distribution patterns in single cells for the mutation load in offspring. The differences in distribution might also reveal yet unknown and possibly genetic mechanisms involved in the segregation of mtDNA mutations, which could open up the possibility to manipulate variations in heteroplasmy levels.

As a large part of patients with OXPHOS defects carry de novo mutations in the mtDNA the load of mutations and polymorphisms in the mitochondrial DNA (mtDNA) of healthy human oocytes, was determined, as these mutations might have originated in the oocyte (chapter 6). Two sensitive and accurate analytical systems to identify these mutations and polymorphisms were used. The mtDNA of 26 oocytes has been screened completely for heteroplasmic mutations using DHPLC analysis. Ten different heteroplasmic mutations, of which one was located in the D-loop and two were observed twice, were detected in seven oocytes with mutation loads ranging from less than 5% to 50%. Furthermore, the mtDNA (with exception of the D-loop region) of four oocytes of a single woman has been screened using a resequencing CHIP (Affymetrix MitoChip®), but no differences between the four oocytes were detected. It is concluded that heteroplasmic mtDNA mutations are common in oocytes and that depending on the position and mutation load they might increase the risk on developing OXPHOS disease early or later in life.

Finally, in the general discussion (chapter 7) the current strategies to improve the quality of life of patients or to prevent the transmission of mtDNA disease are discussed. Since no cure is known at the moment for mitochondrial diseases, only palliative therapies are applied. A number of therapeutic approaches are under development either to complement the genetic defect (for example by allotopic expression of mtDNA encoded proteins) or to reduce the mutation load of mtDNA mutations (for example by selective inhibition of the replication of mutant mtDNA or the stimulation of replication of normal mtDNA), which potentially can alleviate disease manifestations. Furthermore, possible approaches to prevent the transmission of mtDNA mutations, in case PND and PGD is not reliable, are being discussed. Techniques like nuclear transfer (NT) and cytoplasmic transfer (CT) are under development and are currently tested in animal models. Whatever option is considered, it should be technically safe, ethically evaluated and effective, as it is important to realise that the ultimate goal is still to improve the life of people who are dealing with serious illness whether they experience it themselves or with someone they care for.

## Samenvatting

Mitochondriële Encephalomyopathieën zijn aandoeningen geassocieerd met deficiënties in het laatste deel van het mitochondriale energiemetabolisme, de zogenaamde oxidatieve fosforylering (OXPHOS). Recent epidemiologisch onderzoek heeft aangetoond dat ongeveer 1 op de 8000 mensen in de algemene populatie een OXPHOS-aandoening heeft. Daarom leiden OXPHOS-gerelateerde aandoeningen tot significante morbiditeit en mortaliteit. OXPHOS- aandoeningen kunnen worden veroorzaakt door mutaties in het mitochondriale DNA (mtDNA) of in nucleaire genen. Het voornaamste thema van dit proefschrift is het onderzoek naar enerzijds de somatische segregatie en familiale transmissie en anderzijds de oorsprong van heteroplasmische mutaties in het mtDNA. Deze worden onderzocht in relatie tot de klinische expressie en mogelijk modificerende factoren. Onze doelen zijn:

- het ontwikkelen van betrouwbare methodes voor het voorspellen en/of het voorkomen van de transmissie van mtDNA-mutaties, zoals prenatale diagnostiek (PND) en preïmplantatie genetische diagnostiek (PGD);
- het identificeren van factoren die ernst en fenotype of het mtDNA-mutatiepercentage beïnvloeden, om het effect van de overerving van mtDNA mutaties beter te kunnen voorspellen;
- het bepalen van de aanwezigheid en impact van de novo mtDNA-mutaties in eicellen.

Deze doelen zijn bereikt door het bestuderen van kenmerkende patiëntgegevens in samenhang met mtDNA-mutatiepercentage en -overerving en door het bestuderen van de mtDNA-mutaties in de meer unieke situatie van de individuele cel. De mtDNA-mutaties bestudeerd in individuele lymfocyten, fibroblasten en eicellen.

In het inleidende hoofdstuk 2 van dit proefschrift wordt ingegaan op de transmissie van OXPHOS-aandoeningen en methoden om overdracht te voorkomen. De expressie en segregatie van mtDNA-mutaties is afwijkend van die van nucleaire gendefecten en de meest karakteristieke kenmerken van de mitochondriale genen en mutaties worden belicht. Aandoeningen veroorzaakt door nucleaire genmutaties vertonen een normaal mendeliaans overervingspatroon en hebben vaak een meer constante klinische manifestatie dan aandoeningen veroorzaakt door mtDNA-mutaties. De heteroplasmische aard van veel pathogene mtDNA mutaties is een belangrijk kenmerk bij de manifestatie van de aandoening, alhoewel homoplasmische aandoeningen ook bestaan. In het geval van heteroplasmische mtDNA-mutaties worden de aandoeningen pas manifest als het mutatiepercentage een bepaalde weefsel specifieke drempelwaarde overschrijdt. Deze drempelwaarde kan variëren tussen weefsels en patiënten en het is daarom vaak niet mogelijk een exacte correlatie tussen het mutatiepercentage en het fenotypisch tot uiting komen van de aandoening te bepalen. Overerving van mtDNA-mutaties gaat bijna uitsluitend via de moederlijke lijn. Er zijn slechts enkele gevallen beschreven van overerving via de vaderlijke lijn. De (zeer) grote variaties in mutatiepercentage tussen broers en zussen, die al bestaat in de embryonale fase, wordt veroorzaakt door een genetische “flessenhals” (bottleneck) tijdens de vroege



eicelontwikkeling, waardoor slechts een beperkt aantal segregerende units de uiteindelijke samenstelling van het mtDNA in de eicel bepalen. Vanwege het ontbreken van een adequate therapie voor OXPHOS-aandoeningen wordt technisch en ethisch onderzocht of met bestaande en nieuwe methoden de transmissie van deze aandoeningen kan worden voorkomen. Potentiële benaderingen zijn prenataal onderzoek (PND), preïmplantatie genetische diagnostiek (PGD), cytoplasma transfer (CT) en kern transplantatie (NT).

In hoofdstuk 3 wordt het genetisch defect en de klinische gevolgen hiervan bij twee patiënten met Pearson-syndroom beschreven. Dit is een vaak fataal verlopende multisysteemaandoening die geassocieerd is met mtDNA-herschikkingen (o.a. deleties en duplicaties). Het doel was om factoren te identificeren die mogelijk betrokken zijn bij en de ernst kunnen voorspellen van de klinische manifestatie. Deze herschikkingen, voornamelijk deleties, zijn waarschijnlijk het gevolg van onjuiste paring tussen repeterende DNA-sequenties tijdens de mtDNA-replicatie in de zich ontwikkelende eicel. Een vergelijking wordt gemaakt tussen de aanwezigheid van deletiedimeren (een combinatie van twee gedeleteerde fragmenten) en duplicaties (een combinatie van een normaal en een gedeleteerd fragment) en de ernst van de aandoening. Duplicaties lijken een voordelig effect op de ernst van de ziekte te hebben. Door het voornamelijk *de novo* karakter van herschikkingen is de kans op transmissie vele malen kleiner dan voor mtDNA-puntmutaties.

Hoofdstuk 4 beschrijft een familie met drie kinderen met Leigh-syndroom, een progressieve neurodegeneratieve aandoening. De ziekte is gediagnosticeerd op grond van klinische kenmerken, lactaat acidose en een verlaging in de complex V-activiteit. De m.9176T>C mutatie in het ATPase6 gen van het mtDNA is ontdekt met mutatie-analyse. Omdat een matернаal familielid zwanger was, is de mogelijkheid van prenataal onderzoek, en voor eventuele volgende zwangerschappen preïmplantatie genetische diagnostiek, verder geëvalueerd. Het voornaamste probleem hierbij was het gebrek aan data m.b.t. de genotype-fenotype correlatie voor de m.9176T>C mutatie en de variatie van het mutatie-percentages in verschillende weefsels en in de tijd. Van een aantal maternale familieleden zijn aanvullende gegevens verzameld uit meerdere weefsels. Uiteindelijk is prenataal onderzoek aangeboden waarbij het paar bekend was met de bestaande onzekerheden ten aanzien van de interpretatie van de resultaten. Prenataal onderzoek is twee maal verricht op gekweekte en ongekweekte vlokken en vruchtwatercellen om weefsel- en tijds-gerelateerde effecten op het mutatiepercentage te kunnen evalueren. Het foetale mutatie-percentages was lager dan de mogelijke drempelwaarde van 90%, waarboven Leigh syndroom manifest wordt, maar hoger dan het enigszins arbitrair bepaalde veilige percentages van 60%. De ouders hebben besloten de zwangerschap te continueren en na een normale zwangerschap en zwangerschapstermijn is een gezond kindje geboren. Er kan geconcludeerd worden dat het probleem bij prenataal onderzoek van mtDNA-mutaties niet de techniek is, maar de interpretatie van de resultaten.

Om een beter inzicht te krijgen in de verdeling van mtDNA-mutaties tussen enkele cellen en het belang hiervan bij de counseling van dragers ten aanzien van het risico van herhaling, is de m.9176T>C mutatie op het individuele cel-niveau bestudeerd (hoofdstuk 5). Het mutatiepercentage is bepaald in individuele lymfocyten en fibroblasten van verschillende familieleden, patiënten en dragers, met de m.9176T>C mutatie. Onze resultaten tonen een van een normaal afwijkende verdeling in lymfocyten en fibroblasten van drie dragers met een matig mutatieniveau. Het patroon lijkt sterker afwijkend in de fibroblasten. Daarentegen lijkt het verdelingspatroon in lymfocyten en fibroblasten van de twee patiënten met zeer hoge mutatieniveaus (90%) erg op een normaal Gaussiaans verdelingspatroon. In één van de dragers wordt een extreem afwijkend patroon gevonden in de fibroblasten, waarbij percentages vooral richting 0% en 100% gaan. Alhoewel het bekend is dat heteroplasmie migreert naar homoplasmie van òf de mutatie òf het wild-type, tijdens celdeling, tonen onze gegevens aan dat dit verschilt tussen celtype en individuen en in eicellen sneller kan gebeuren dan verwacht. Dit zou kunnen betekenen dat er (genetische) factoren bestaan die het verdelingspatroon beïnvloeden. Als dezelfde factoren de mutatiebelasting in eicellen beïnvloeden, kan dit van belang zijn bij het bepalen van het herhalingsrisico. De drager met de extreem afwijkende verdeling heeft drie kinderen met erg hoge mutatie-niveaus en ernstige ziektesymptomen, wat past bij onze hypothese. Meerdere onderzoeken op het niveau van de individuele cel zijn nodig in grote families om de voorspellende waarde van het verdelingspatroon in individuele cellen voor het mutatieniveau bij nakomelingen te bepalen. De verdelingsverschillen kunnen mogelijk ook nog onbekende, mogelijk genetische, mechanismen onthullen die betrokken zijn bij de segregatie van mtDNA-mutaties. Dit kan ingangen opleveren om het heteroplasmieniveau te beïnvloeden.

Omdat een groot deel van de patiënten met OXPHOS-aandoeningen een *de novo*-mutatie in het mtDNA dragen en deze mutaties waarschijnlijk zijn ontstaan in de eicellen, zijn gezonde eicellen onderzocht op de aanwezigheid van heteroplasmische varianten in het mtDNA (hoofdstuk 6). Hiervoor werd gebruik gemaakt van twee gevoelige en nauwkeurige analysemethoden om varianten op te sporen. Het mtDNA van 26 eicellen is volledig gescreend op heteroplasmische varianten m.b.v. DHPLC-analyse. Tien verschillende heteroplasmische varianten, waarvan er één is gelokaliseerd in de D-loop en twee tweemaal zijn gevonden, zijn gedetecteerd in zeven eicellen waarbij het percentage varieerde van minder dan 5% tot 50%. Verder is het mtDNA (met uitzondering van de D-loop) van vier eicellen verkregen van één donor gescreend door gebruik te maken van een resequencing CHIP (Affymetrix MitoChip®), maar er zijn geen verschillen tussen de vier eicellen gedetecteerd. Er kan geconcludeerd worden dat heteroplasmische varianten in het mtDNA gangbaar zijn in eicellen en dat afhankelijk van de locatie in het mtDNA en het percentage dit het risico op een OXPHOS-aandoening in een vroeg of later levensstadium kan verhogen.

Uiteindelijk worden in de algemene discussie (hoofdstuk 7) de huidige strategieën bediscussieerd die worden gebruikt ter verbetering van de levenskwaliteit van patiënten of om



transmissie van mtDNA-aandoeningen te voorkomen. Omdat momenteel genezing niet mogelijk is bij mitochondriale aandoeningen, worden alleen palliatieve therapieën toegepast. Er zijn een aantal nieuwe therapeutische benaderingen in ontwikkeling die of het genetische defect aanvullen (bijvoorbeeld door de allotopische expressie van mtDNA gecodeerde eiwitten), of de mutatiebelasting van de mtDNA-mutatie verminderen (bijvoorbeeld door de selectieve remming van de replicatie van het gemuteerde mtDNA of de stimulatie van de replicatie van het normaal mtDNA). Deze therapieën kunnen mogelijk op termijn de ziekteverschijnselen verminderen. Verder worden er nog mogelijke benaderingen bediscussieerd, indien PND en PGD niet betrouwbaar kunnen worden uitgevoerd. Technieken zoals kerntransplantatie (NT) en cytoplasma-overdracht (CT), zijn in ontwikkeling en worden momenteel getest op dieren. Welke optie ook in beschouwing wordt genomen, wat belangrijk is, is dat nieuwe methoden met name uit technisch oogpunt veilig zijn, ethisch geëvalueerd en effectief. Het is van groot belang zich te blijven realiseren dat het uiteindelijke doel het verbeteren van de levenskwaliteit van mensen is, die te maken hebben met een ernstige aandoening, of ze deze nu zelf dragen of dat deze aanwezig is bij iemand voor wie ze zorgen.